



REPÚBLICA ARGENTINA
PODER EJECUTIVO NACIONAL
MINISTERIO de ECONOMÍA y PRODUCCIÓN
SECRETARÍA de INDUSTRIA, COMERCIO y de la PEQUEÑA y MEDIANA EMPRESA
INSTITUTO NACIONAL de la PROPIEDAD INDUSTRIAL

CERTIFICADO DE
DEPÓSITO

ACTA N° P 19980105611

LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE PATENTES, CERTIFICA QUE CON FECHA 6 DE NOVIEMBRE DE 1998 SE PRESENTO A NOMBRE DE BIO SIDUS S.A.; CON DOMICILIO LEGAL EN ALSINA 971,1° OF. 10.-CAPITAL, REPUBLICA ARGENTINA (AR).

UNA SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION RELATIVA A: PROCEDIMIENTO DE CULTIVO MASIVO DE CELULAS DE MAMIFERO RECOMBINANTES, PARA LA OBTENCION DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE

CUYA DESCRIPCION Y DIBUJOS ADJUNTOS SON COPIA FIEL DE LA DOCUMENTACION DEPOSITADA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

SE CERTIFICA QUE LO ANEXADO A CONTINUACION EN 17 FOJAS ES COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE LA ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES DE LA REPUBLICA ARGENTINA DE LOS DOCUMENTOS DE LA PATENTE DE INVENCION PRECEDENTEMENTE IDENTIFICADA.

A PEDIDO DEL SOLICITANTE, EXPIDO LA PRESENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, A LOS 13 DIAS DEL MES DE ABRIL DE 2005.



DR. EDUARDO ARIAS
COMISARIO
ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT



INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
ARGENTINA

BEST AVAILABLE COPY



Patentes de Invención
Modelos de Utilidad



Marcas



Modelos y Diseños
Industriales



Transferencia de
Tecnología



Información
Tecnológica



I.N.P.I.

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION: ☒

MODELO DE UTILIDAD: ☐

Fecha de Presentación:

Acta N° 12 71
CASA DE ENTRADAS

I. SOLICITANTE:

1) Apellido y Nombre/Denominación o Razón Social:

BIO SIDUS S.A.

2) Documento de Identidad: /

Estado Civil: /

Nupcias: /

Nombre del Cónyuge: /

3) Caja de Jubilación o AFJP: C.U.I.T. /

N° de CUIL o CUIT:

30-59811709-4 IVA: Resp. Inscripto

4) Inscripto en el Registro Industrial de la Nación (Decreto-Ley 19.971/72) N°

5) Domicilio: Real: CONSTITUCION 4234 - BUENOS AIRES - ARGENTINA

Legal: ALSINA 971 - 1° Piso Of. 10 - BUENOS AIRES - ARGENTINA

II. Objeto:

6) Título de la Invención: "PROCEDIMIENTO DE CULTIVO MASIVO DE CELULAS DE MAMIFERO RECOMBINANTE PARA LA OBTENCION DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE"

7) Carácter de la Patente:

Definitiva, por el término de Veinte años

Adicional a la Solicitud N°/Patente N°

Divisional de la Solicitud N°

8) Ley 17.011. Fecha Prioridad

País

N°

III. Documentación acompañada

- 9) Se acompaña:
- a) Comprobante pago de servicio requerido
 - b) Formulario (ANEXO II) hoja técnica en duplicado
 - c) Carátula en duplicado



- d) Memoria descriptiva en duplicado
e) Reivindicaciones en duplicado firmadas
f) Dibujos en triplicado
g) Número de Planchas
h) Resumen (Anexo I)
i) Copia certificada (Ley 17.011)
j) Documento de Cesión
k) Dibujos informales

X
X
X

02

IV Sociedades

10) Sociedad, representada por: HUMBERTO MARIO DE PASQUALE

quien declara bajo juramento que inviste el carácter de APODERADO

que su mandato se encuentra vigente y que la Sociedad se halla inscripta en

Fecha: 7/10/83 N°. 7258 Fº -- Lib. 98 Tº A

V. Mandato

11) Poder Inscripto en: _____ Registrado en el INPI bajo N°: _____

Otro Registro: _____ N°: _____

12) En este acto, se autoriza a: CARLOS MIGUEL COLL ARECO Y/O HUGO EDUARDO MARTINEZ LAHITOU.

13) Se acompaña poder ☐

14) Caja Jubilación o AFJP: CONSOLIDAR N° CUIL 6 CUIT: 20-04991729-6

20-16821007-9

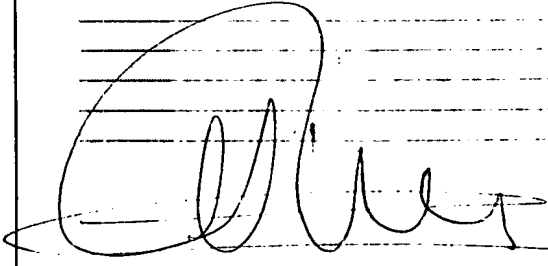
15) Agente N°. 611/900

VI. Declaración

16) A los efectos del Decreto del 7 de Junio de 1901 (sobre patentabilidad en el extranjero) manifiesta que el invento NO ha sido patentado en el extranjero.

VII Observaciones

Conforme al art. 19 de la Ley 24.481 y su Decreto Reglamentario se aportarán complementos dentro del objeto declarado.


CARLOS MIGUEL COLL ARECO
Matr. 611

(Firma del autorizado)


HUMBERTO MARIO DE PASQUALE
Apoderado

(Firma del solicitante)

03

Memoria Descriptiva de la Patente de Invención

Sobre

Procedimiento de cultivo masivo de células de mamífero recombinantes, para obtención de Eritropoyetina Humana Recombinante.

Solicitada por
Bio Sidus S.A.

Por el plazo de 20 años



Constitución 4234 - 1254
Buenos Aires - Argentina

LA PRESENTE PATENTE DE INVENCION SE REFIERE A UN PROCEDIMIENTO DE CULTIVO MASIVO DE CELULAS DE MAMIFERO RECOMBINANTES, PARA LA OBTENCION DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE

A pesar de existir abundante literatura referida a la producción de Eritropoyetina humana recombinante (EPO) en cultivo de células de mamífero, no se ha descrito un método que lleve a la producción de cantidades de esta proteína suficientes para su uso industrial en medicina humana, con la calidad, productividad y reproducibilidad que este proceso requiere. Por otra parte, con el uso de los medios y sistemas de cultivo conocidos para la producción de EPO tampoco se obtiene una productividad con calidad y reproducibilidad comparables a la obtenidas con esta invención.

El presente invento describe un método que permite la producción masiva de EPO con las características necesarias para su aprovechamiento industrial en medicina humana. Con el novedoso método de esta invención se logran obtener una alta recuperación y una productividad inesperadamente alta de EPO con bajo contenido de proteínas en el medio de cultivo, lo que facilita la posterior purificación de EPO. Ello se logra mediante la suplementación del medio de cultivo con insulina. Un valor adicional del método lo da la reproducibilidad con que la EPO se obtiene en diferentes lotes de producción y la altísima calidad de la proteína así producida.

La invención consiste en novedosas combinaciones de sistemas y medios de cultivo, que conducen a los resultados descritos anteriormente.

Novedad del invento - objeto principal

El procedimiento a que se refiere la presente patente de invención consiste en la producción masiva de EPO a través del cultivo de células de mamífero recombinantes productoras de EPO según el siguiente esquema:

Se toma un frasco T 25 con células recombinantes productoras de EPO, obtenido según el Anexo I y se lleva a cabo una sucesión de etapas de expansión como sigue:

A. Expansión 1: Las células obtenidas en el punto B se despegan del frasco T25 donde se crecieron, mediante el tratamiento con solución de tripsina siguiendo protocolos de uso común en cultivo celular, y se siembra 1/5 de las células en cada uno de 5 frascos T 25, que contienen 10 ml de medio de cultivo # 2 (ver tabla 1). Las células se cultivan durante 48 horas a 37 ° C.

B. Expansión 2: Las células obtenidas en la expansión 1 se despegan de los frascos T25 donde se crecieron, mediante el tratamiento con solución de tripsina siguiendo protocolos de uso común en cultivo celular, y se siembran las células de cada T 25 en un frasco T 150, con 75 ml de medio de cultivo # 1 (ver tabla 1). Las células se cultivan entonces durante 72 horas a 37 ° C.

C. Expansión 3: Las células obtenidas en la expansión 2 se despegan de los frascos T150 donde se crecieron, mediante el tratamiento con solución de tripsina siguiendo protocolos de uso común en cultivo celular. Se siembra 1/10 de las células provenientes de cada T 150 en un nuevo frasco T 150, con 75 ml de medio de cultivo # 1 (ver tabla 1). Las células se cultivan entonces durante 72 horas a 37 ° C.

D. Expansión 4: Las células obtenidas en la expansión 3 son despegadas de los frascos T150

donde se crecieron, mediante el tratamiento con solución de tripsina siguiendo protocolos de uso común en cultivo celular. Se siembran las células provenientes de cada T 150 en un frasco "roller" de 850 cm² de superficie interior, con 200 ml de medio de cultivo # 1 (ver tabla 1). Las células se cultivan entonces durante 72 horas a 37 °C.

E. Siembra de células en los frascos "roller" para producción.

La etapa productiva propiamente dicha comienza con la siembra de células en frascos "roller" (850 cm² de superficie) con las células provenientes del paso de expansión 4 descrito en el punto D, en 200 ml de medio de cultivo # 1 repitiendo la metodología antes descrita. Con las células provenientes de cada frasco de la etapa de expansión 4 del punto C se cultivan 15 frascos "roller" de acuerdo a las siguientes condiciones:

Medio de cultivo # 1

Tiempo de cultivo: 72 hs.

Concentración de gases: atmósfera natural

Temperatura: 37 ° C.

Cuando la monocapa celular se ha formado, lo que se verifica con observación al microscopio invertido, se descarta el medio de cultivo, se lavan las células con solución Hank's y se continúa el cultivo en medio # 3.

Luego se procede cada 48 horas, bajo estrictas condiciones de esterilidad, a la cosecha y reposición del sobrenadante de cultivo de cada "roller", que contiene EPO. Este proceso se repite por lote de producción en 5 oportunidades.

F. Recuperación (cosecha).

Tal como se describió en la etapa E, cada 48 horas se procede a cosechar el sobrenadante de

cultivo, el cual es concentrado 100 veces utilizando un sistema de filtración tangencial a través de membranas con un corte de peso molecular de 3000 D, (Amicon S10Y3), el concentrado es filtrado estéril. El material concentrado se conserva congelado a -20°C . Finalmente, se procede a reconcentrar el “pool” de fracciones previamente concentradas utilizando un sistema de ultrafiltración tangencial similar al anterior, el concentrado es esterilizado por filtración a través de membranas con poros de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro.

La solución estéril así obtenida proveniente del cultivo de células recombinantes, que tiene una alta concentración de EPO y escasas proteínas contaminantes, puede ser utilizada tal cual se obtiene o, para algunos usos como el tratamiento de humanos, puede ser ulteriormente purificada.

ANEXO I

1. Microorganismo recombinante.

El microorganismo productor es una línea de células de mamífero (CHO) transfectada con el ADN genómico de la eritropoyetina humana. Este clon de células productoras se almacena congelado en nitrógeno líquido en los respectivos Bancos Celulares (Master y Working Bank), el congelamiento se hace siguiendo métodos usuales de esta tecnología.

2. Descongelamiento

Se descongelan las “semillas” del clon productor, provenientes del Working Bank donde se preservan congeladas en N_2 líquido y se procede a su cultivo en fase sólida estacionaria (Frascos T 25) en 10 ml medio de cultivo # 1 (ver tabla 1). El cultivo celular se desarrolla a 37°C , durante 24 h en atmósfera con 5 % de CO_2 . Posteriormente se cambia el medio de

cultivo permaneciendo las células en 10 ml de medio # 2 (ver tabla 1), a la misma temperatura y durante otras 24 h.

Tabla Número 1

Medio de Cultivo # 1

Medio Base + Suero Fetal Bovino 10 %.

ISCOVE's DMEM	8.85	g/litro	Triptofano	27	mg/litro
HAM F12	5.35	g/litro	Asparagina	40	mg/litro
CO ₃ HNa	2.10	g/litro	Serina	80	mg/litro
Glucosa	1.30	g/litro	Etanolamina	3	µl/litro
Lactosa	0.20	g/litro	Glutamina	1.90	g/litro
Galactosa	0.20	g/litro	Suero Fetal Bovino	100	ml/litro
Piruvato de Na	0.11	g/litro			

Medio de Cultivo # 2

Medio Base + Suero Fetal Bovino 10 % + Geneticin 0.5 mg/ml

ISCOVE's DMEM	8.85	g/litro	Triptofano	27	mg/litro
HAM F12	5.35	g/litro	Asparagina	40	mg/litro
CO ₃ HNa	2.10	g/litro	Serina	80	mg/litro
Glucosa	1.30	g/litro	Etanolamina	3	µl/litro
Lactosa	0.20	g/litro	Galactosa	0.20	g/litro
Piruvato de Na	0.11	g/litro	Suero Fetal Bovino	100	ml/litro
Glutamina	1.90	g/litro	Geneticin	500	mg/litro

Medio de Cultivo # 3

Medio Base + Insulina

ISCOVE's DMEM	8.85	gr/litro	Triptofano	27	mg/litro
HAM F12	5.35	g/litro	Asparagina	40	mg/litro

CO ₃ HNa	2.10	g/litro	Serina	80	mg/litro
Glucosa	1.30	g/litro	Etanolamina	3	μl/litro
Lactosa	0.20	g/litro	Insulina	10	mg/litro
Galactosa	0.20	g/litro	Piruvato de Na	0.11	g/litro
Glutamina	1.90	g/litro			

Solución HANK's

Cl ₂ Ca . 2H ₂ O	185	mg/litro	PO ₄ HNa ₂	47.8	mg/litro
SO ₄ Mg . 7 H ₂ O	140	mg/litro	Glucosa	1.0	g/litro
ClK	400	mg/litro	CO ₃ HNa	350	mg/litro
PO ₄ H ₂ K	60	mg/litro	Rojo Fenol	11	mg/litro
ClNa	8.0	g/litro			

EJEMPLO 1

Se procedió a cultivar células CHO recombinantes productoras de EPO, siguiendo el método materia de la presente invención. Posteriormente, se llevó a cabo la siembra de 3000 frascos "roller" según el punto E. Las posteriores cosechas de medio de cultivo fueron concentradas de acuerdo al punto F.

La densidad celular alcanzada por cm² resultó de aproximadamente 180.000 células, la viabilidad de las mismas osciló entre el 95 y 98 % a lo largo de todo el procedimiento. El volumen total de medio cosechado fue de 2900 litros. El concentrado de acuerdo al punto F rindió un volumen de 29.5 litros.

Los valores obtenidos por cosecha en el material concentrado fueron:

Cosecha	EPO-RIA (mg/ml)	EPO-RIA (g)	Prot. Tot. (mg/ml)	Prot. Tot. Gramos
1	0.90	26.55	1.74	51.33
2	1.29	38.05	3.25	95.87
3	1.28	37.76	3.39	100.0
4	1.10	32.45	4.57	134.8
5	1.12	33.04	5.48	161.7
TOTAL		167.85		543.7

La ausencia de suero fetal bovino y/o otros reactivos indefinidos de origen animal, permite obtener en este paso una EPO con un nivel de pureza inicial inusualmente elevado, de aproximadamente el 30 %, ya que mediante el uso de insulina se evita el agregado de otras proteínas, que serían contaminantes del producto finalmente obtenido.

Lo usual utilizando un medio de cultivo tradicional, con 10 % de suero fetal bovino, resultaría en una pureza de la EPO obtenida inferior al 1 %.

Posteriormente se procedió a la purificación de la EPO obtenida, recuperándose el 25 % (medido por actividad biológica *in vivo*), rendimiento sorprendentemente alto, que se debe al bajo nivel de impurezas presente en el sobrenadante de cultivo. Se comprobó la calidad de la EPO producida por medio de los siguientes análisis:

La EPO obtenida cultivando las células del presente ejemplo fue llevada a pureza y luego sometida a diferentes estudios identificatorios:

1. En un gel desnaturalizante SDS-PAGE corrió como una banda ancha de más de 30 kDa de peso molecular.
2. Esa banda fue reconocida por un anticuerpo monoclonal así como por un anticuerpo policlonal contra Epo humana en un ensayo "Western blot".
3. El tratamiento con glicanasas probó la existencia de las cadenas glicosídicas en cantidad y peso molecular acorde a lo esperado.
4. La EPO producida mostró estar compuesta por una serie de especies de punto isoeléctrico comprendido entre 3,0 y 4,5
5. La secuenciación completa de aminoácidos de la proteína aislada y purificada a partir del sobrenadante de cultivo de las líneas celulares transfectadas mostró total homología con la eritropoyetina humana natural que posee la siguiente secuencia de 165 aminoácidos.

NH ₂ –	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu
	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	<u>Asn</u>
	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	Hys	Cys	Ser	Leu	Asn
	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe

Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala
Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu
Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	<u>Asn</u>	Ser
Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	Hys	Val	Asp
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu
Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser
Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	<u>Ser</u>	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr
Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr
Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp—COOH			

X sitios de glicosilación

6. La presencia de los cuatro sitios de glicosilación sobre la cadena de 165 aminoácidos así como la estructura de hidratos de carbono, fundamentalmente los residuos de ácido siálico terminales, fueron demostrados conjuntamente con su correcta actividad biológica

in vivo, en el modelo de ensayo del ratón policitémico ex-hipóxico, exhibiendo total paralelismo frente al estándar internacional correspondiente.

REIVINDICACIONES

Habiendo descripto y ejemplificado la naturaleza y objeto principal de la presente invención, como así también la manera en que la misma se puede llevar a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y de derechos exclusivos.

- 1.- UN PROCEDIMIENTO DE CULTIVO MASIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO RECOMBINANTES, PARA LA OBTENCIÓN DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE, caracterizado porque el medio de cultivo productivo contiene insulina como único agregado proteico.
- 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las células utilizadas son células CHO, COS, BHK, Namalwa, HeLa u otra células de mamífero.
- 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las células utilizadas son células CHO.
- 4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la alta productividad de EPO de alta calidad que se obtiene y su reproducibilidad lo hace aplicable a escala industrial.
- 5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la cantidad de insulina agregada es mayor que 1 mg/litro de medio de cultivo.

- 6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la cantidad de insulina agregada es menor de 20 mg/litro de medio de cultivo.
- 7.- El método reivindicado en 1, caracterizado porque se incuban las células en atmósfera natural.
- 8.- El método reivindicado en 1, caracterizado porque utiliza un medio de cultivo libre de suero fetal bovino.
- 9.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la EPO obtenida se encuentra con una pureza mayor al 15%.



BIO SIDUS S.A.
HUMBERTO M. DE PASQUALE
APODERADO

RESUMEN

La presente patente de invención describe un proceso de cultivo masivo de células de mamífero recombinantes, productoras de EPO. El proceso productivo sigue diferentes etapas de expansión, partiendo de células viables conservadas congeladas (Master y Working banks). Posteriormente, se pasa a una etapa productiva en la que se utilizan medios de cultivo especialmente formulados para evitar el agregado de suplementos proteicos.

El sistema consigue obtener una elevada productividad de EPO que se encuentra con alta pureza en el medio de cultivo cosechado. La suplementación con insulina es uno de los aspectos clave del método.

El sobrenadante de cultivo es finalmente concentrado para obtener mayor concentración de EPO en una forma apropiada para ser utilizada tal cual se obtiene o purificada ulteriormente para los usos que así lo requieran.

HOJA TECNICA

17



(19)

I.N.P.I.

REPUBLICA ARGENTINA

(10)

PUBLICACION N° AR
I.N.P.I.

(21)

SOLICITUD N° 12 41

(51)

INT. CL. MESA DE ENTRADAS

P 98 01 056 11

(12) ☐

PATENTE DE INVENCION

☐

MODELO DE UTILIDAD

(22)

FECHA PRESENTACIÓN: 6-11-98
AR-11-980105611

(71)

SOLICITANTE(S): Bio Sidus S.A.

(30)

DATOS PRIORIDAD:

(72)

INVENTOR(ES):

(41)

FECHA PUBLICACION SOLICITUD:
BOLETIN N°:

(74)

AGENTE: 611

(61)

ADICIONAL A:

(83)

DEPOS. MICROORGANISMOS:

(62)

DIVISIONAL DE:

(54) TITULO DE LA INVENCION: **PROCEDIMIENTO DE CULTIVO MASIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO RECOMBINANTES, PARA LA OBTENCIÓN DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE**

(57) RESUMEN:

La presente patente de invención describe un proceso de cultivo masivo de células de mamífero recombinantes, productoras de EPO. El proceso productivo sigue diferentes etapas de expansión, partiendo de células viables conservadas congeladas (Master y Working banks). Posteriormente, se pasa a una etapa productiva en la que se utilizan medios de cultivo especialmente formulados para evitar el agregado de suplementos proteicos.

El sistema consigue obtener una elevada productividad de EPO que se encuentra con alta pureza en el medio de cultivo cosechado. La suplementación con insulina es uno de los aspectos clave del método.

El sobrenadante de cultivo es finalmente concentrado para obtener mayor concentración de EPO en una forma apropiada para ser utilizada tal cual se obtiene o purificada ulteriormente para los usos que así lo requieran.

AR

FIGURA MAS REPRESENTATIVA N°: